

**Veränderungen von verschiedenen Plasmaproteinen
unter Einwirkung von Plasmin
bei in vitro-Behandlung**

Michael Steppeler

1975

Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. H. Spiess

Veränderungen von verschiedenen Plasma-
proteinen unter Einwirkung von Plasmin
bei in vitro-Behandlung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Michael S t e p p e l e r

aus München

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. J. Suschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Spieß

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 1975



Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

I Einleitung

Die fibrinolytische Therapie mit Urokinase aktiviertem Plasmin (UaP) wird seit einigen Jahren diskutiert. Jedoch stehen einer breiten klinischen Erprobung die zur Zeit noch unverhältnismäßig hohen Herstellungskosten im Wege. So muß zunächst der Plasminaktivator Urokinase aus menschlichem Urin gewonnen werden. Das geschieht entweder durch Adsorption an BaSO_4 oder durch Adsorption an Siliciumgel mit nachfolgender Amberlite JRC-50- Chromatographie (20) Plasminogen wird aus menschlichem Plasma durch Säurefällung und 10stündige Pasteurisation gewonnen, bevor es mit Urokinase zu Plasmin aktiviert wird (11).

Diesem aufwendigen Herstellungsverfahren steht die wesentlich wirtschaftlichere Streptokinaseherstellung gegenüber. Dennoch gibt es Situationen, in denen man nicht auf eine Therapie mit Urokinase verzichten kann (22,25). Sie wird angewandt bei Coronarinfarkten, embolischen Geschehen und Thrombosen, vor allem dann, wenn der Patient einen zu hohen Antistreptokinasetiter aufweist. So kann man unerwünschte, gefährliche allergische Reaktionen durch das Bakterienantigen Streptokinase vermeiden. (8) Außerdem schwanken bei der Urokinasetherapie die individuellen Wirkungs Dosen nicht so wie bei der Streptokinasetherapie. (11) Wenn mit den thrombotischen oder embolischen Geschehen ein Plasminogenmangel einhergeht, ist eine Therapie mit UaP angezeigt, da sowohl Streptokinase als auch Urokinase zu schnell

die körpereigenen Plasminogenvorräte erschöpfen würden. Besondere Aufmerksamkeit fand in letzter Zeit die Applikation von UaP zur Therapie des sog. Atemnotsyndroms (respiratory distress syndrom). Ziel der Therapie war die Verhinderung oder aber Beseitigung hyaliner Membranen in der kindlichen Lunge.

Diese Therapie mit UaP basiert auf folgenden Überlegungen:

(1)

1. Die Grundsubstanz der pulmonalen hyalinen Membranen ist Fibrin.
2. Die Membran behindert den Gasaustausch und stellt somit ein wichtiges Glied der pathologischen Kette eines circulus vitiosus dar.
3. Die Plasminogenwerte Neugeborener sind niedrig, die Plasminogenwerte Frühgeborener und der Kinder mit Atemnotsyndrom sogar noch niedriger.

(1,17 und eigene Untersuchungen)

Ambrus und Mitarbeiter infundierten 5 RPMJ U/kg UaP in die Umbilicalvene und ließen außerdem täglich 60 RPMJ U/kg UaP inhalieren bis die Zeichen des Atemnotsyndroms verschwunden waren.

Aufgabenstellung:

Doch bevor die fibrinolytische Therapie mit UaP allgemein eingeführt werden kann, muß geklärt werden, ob UaP irgendwelche Nebenwirkungen auf die Plasmaproteine des Menschen hat und wenn ja, ab welcher Dosierung mit solchen zu rechnen ist.

Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Plasmainhibitoren, die Macroglobuline und Immunglobuline gerichtet.(3)

Die Macroglobulinfraktion war deshalb interessant, da Spock und Mitarbeiter in ihr einen Hemmfaktor vermuten, der bei Mukoviszidose auftritt. Diese Autoren konnten nämlich zeigen, daß die rhythmischen Zilienbewegungen der Kaninchen-Trachealmukosa unter der Einwirkung von Serum von Patienten mit Mukoviszidose gestört wurden und einer Asynchronie anheimfielen.

(21)

Ferner wurde die Wirkung von UaP auf das Gerinnungssystem untersucht. Im Vordergrund stand dabei die Frage nach der unterschiedlichen Affinität von UaP zu Fibrin und Fibrinogen.

II Material und Methode

Es wurden in vitro Versuche mit Humanplasma durchgeführt. Zunächst wurde in einer Vorversuchsreihe die Wirkung extrem hoher UaP Mengen auf die Plasmaproteine untersucht, um auf diese Weise von vorneherein zu klären, ob überhaupt Veränderungen nachzuweisen waren.

1. Einer von zwei 150 μ l Plasmaproben wurde ca. 2 mg UaP zugesetzt ($\hat{=}$ 3000 E/kg Körpergewicht).

Beide Proben wurden 2 1/2 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Später wurde die Inkubationszeit auf 1 1/2 Stunde reduziert, da die Versuche keine Unterschiede im Grad der Veränderungen zeigten. Auch wurde auf eine Carbamylierung verzichtet, nachdem sich herausgestellt hatte, daß die zu untersuchenden Eiweißfraktionen in dem verwendeten Gel fast nur anodenwärts liefen. Eventuelle Verdünnungen des Plasmas wurden mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt.

2. Die zweite Testreihe befaßte sich mit der quantitativen Auswertung der Wirkung dreier verschiedener Plasmin-dosierungen in vitro (entsprechend/ 15/150/1500 E/kg Körpergewicht). Als Kontrolle diente immer die jeweilige unbehandelte Plasmaprobe.

Die Berechnung der UaP Einheiten pro kg Körpergewicht legen einen 75kg schweren Menschen zugrunde. Da ca. 4% des Körpergewichtes Plasma ist, errechnet sich ein Plasmavolumen von 3 Litern. Die für therapeutische Zwecke vorgeschlagene Plasmindosierung (A) beträgt ungefähr

15 E/kg KG, das entspricht 1125 E UaP auf die 3 l Plasma eines 75kg Menschen oder 0,375 E/ml Plasma. Als zweite Dosierung (B) wurde das Zehnfache der Normalmenge, das heißt 3,75 E/ml Plasma, als dritte Dosierung (C) das Hundertfache, das ist 37,5 E/ml Plasma gewählt.

Der Inhalt einer Ampulle UaP, entsprechend 125 E, wurde in 1 ml Glucose 5% gelöst ($1 \mu\text{l}$ Plasmin Glucose $\hat{=}$ 0,125 E) und die Lösung wurde, wie aus Tab. I ersichtlich, mit Plasma vermischt. Es wurde jeweils mit Glucose 5% auf 300 μl aufgefüllt, um die verschiedenen Konzentrationen, was den Proteingehalt der jeweiligen Verdünnung betrifft, miteinander vergleichen zu können.

Tab. I

	ml Plasma	μl UaP- Gluc.	E/ml Plasma	E/kg KG	μl Gluc. 5%	μl total
K	1	-	-	-	300	1300
A	1	3	0,375	15	300	1303
B	1	30	3,75	150	270	1300
C	1	300	37,5	1500	-	1300

Behandelte und unbehandelte Proben wurden wie oben beschrieben inkubiert, notwendige nochmalige Verdünnungen z.B. für die Elektroimmundiffusion nach Laurell mit Physiologischer NaCl Lösung vorgenommen. Die Reste der inkubierten Proben wurden tiefgefroren konserviert.

3 Um Veränderungen der Plasmaproteine zu untersuchen, bedient man sich seit langem verschiedener Immunpräzipitationsverfahren. Ein Präzipitat kommt immer dann zustande, wenn ein Antigen (AG) auf seinen spezifischen Antikörper (AK) trifft. Der Eiweißgehalt des AG-AK-Immunkomplexes sowie die Antigenität sind dabei direkt proportional der Stärke des Präzipitates. Der Ort des Präzipitates zwischen AG- und AK-Auftragsstelle läßt Rückschlüsse zu auf das AG-AK-Verhältnis. Bei konstanter Antiserumdosierung rückt das Präzipitat umso weiter in den Antikörperbereich, je stärker die Antigenkonzentration ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld ist abhängig von der Molekülgröße und -form sowie der elektrischen Ladung des jeweiligen Proteins.

Um die Veränderungen der zu untersuchenden Eiweißfraktionen umfassender beurteilen zu können, wurden sie mit mehreren verschiedenen Immunpräzipitationsmethoden untersucht. Dabei wurde auf die Anwendung der radialen Immundiffusion verzichtet, da durch Urokinase- oder UaP-Behandlung entstehende Bruchstücke wegen ihrer Antigengemeinschaft mit dem Muttermolekül zusammen mit diesem ausgefällt wurden und so eine Zunahme der Proteinkonzentration vortäuschten, in anderen Fällen eine Abnahme oder ein Gleichbleiben der Konzentration zeigten. Dadurch war eine sinnvolle Deutung der Proteinveränderung nicht möglich.

- 3.1 Folgende Methoden wurden angewandt:
Doppeldiffusion nach Ouchterlony (5)

Wie für alle anderen Geldiffusionsverfahren wurde ein 1%iges Agarosegel mit Barbituratpuffer pH 8,6/0,024 mol hergestellt und 3 ml dieser Lösung nach Erhitzen auf einen fettfreien Objektträger pipettiert. Nach dem Erkalten wurden mittels Stanzschablone 6 kreisförmig angeordnete Löcher und ein zentral gelegenes Stanzloch ausgehoben. In die peripheren Löcher wurde das gewünschte Antigen, in die zentrale Auftragstelle das jeweilige Antiserum eingefüllt (je 10 μ l). 20 Stunden wurde der Objektträger in einer feuchten Kammer aufbewahrt, bevor die Ergebnisse abgelesen werden konnten. Zum Zwecke der besseren Dokumentation wurden sämtliche Präparate gefärbt. Nachdem mindestens 5 Stunden in physiologischer NaCl-Lösung die nicht ausgefällten Eiweiße herausgespült wurden, kamen die mit einem feuchten Filterpapier bedeckten Platten zum Trocknen in den Brutschrank (37°C). Zum Färben wurde der Objektträger 15 Minuten in eine 0,1 %ige Ponceau S-Lösung gelegt, mit Entfärber (2% Eisessig + 10% Glycerin, Aqua dest.ad 100%) 1/2 Stunde ausgewaschen und zum Trocknen erneut in den Brutschrank gelegt.

- 3.2. Immunelektrophorese (IE) nach Grabar und Williams.(5)
- Die Gelplatten waren mit Agarose 1% und Barbituratpuffer pH 8,6/0,024 mol, der auch Kammerpuffer war, vorbereitet worden. Beidseits der in der Mitte gelegenen noch nicht ausgehobenen Antiserumrinne, wurde je eine Antigenauftragstelle herausgestantzt und behandeltes und unbehandeltes Plasma eingefüllt. Die Stromverbindung stellte ein Filterpapier Schleicher-Schüll 2043 her. Bei konstanter Stromstärke

I = 30 mA und 250 V dauerte die Elektrophorese 70 Minuten. Anschließend wurde die vorgestanzte Antikörperrinne ausgehoben und Antiserum eingefüllt. Die Objektträger standen dann während der Immunpräzipitation mindestens 12 Stunden in der feuchten Kammer. Trocknen und Färben wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

3.3 Zwei dimensionale Immunelektrophorese nach Laurell, modifiziert nach Clarke/Freeman (6)

Diese Methode kann als Kombination der einfachen Agarosegel-Elektrophorese mit der Elektroimmundiffusion nach Laurell angesehen werden. Auf ein Diapositivglas (5x5 cm) wird ein 1 cm breiter Streifen eines 1% Agarosegels (Barbituratpuffer pH 8,6/0,024 mol) gegossen. Auf der kathodennahen Seite wird ein Loch ausgestanzt und Plasma eingefüllt. Die Stromverbindung wird mit Filterpapier Schleicher-Schüll 2043 hergestellt. Bei I = konstant = 25 mA und 250V dauerte die Auftrennung in der 1. Dimension 1/2-3/4 Stunde. Kammerpuffer war Barbituratpuffer pH 8,6 / 0,024 mol.

Für die zweite Dimension wird der gleiche Agarosegel bei 56°C mit einem monospezifischen Antiserum vermengt und auf das Diapositiv gegossen. Die Gelplatte wird um 90 Grad gedreht wieder in die Elektrophoresekammer gelegt und bei einer konstanten Stromstärke von I = 6 mA und 50 V länger als 15 Stunden in der Kammer gelassen. Trocknen und Färben wie oben.

3.4. Elektroimmundiffusion nach Laurell ("Raketen"-Technik) (6)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der elektro-phoretischen Wanderung eines Antigens in einem Gel, das ein monospezifisches Antiserum in gleichmäßiger Verteilung enthält. Die Länge des Präzipitats ist proportional zur Konzentration des Antigens (13). Eine 1%ige Agaroselösung wird unter Verwendung von Barbituratpuffer pH 8,6/0,024 mol hergestellt. Die Zumischung des spezifischen Antiserums erfolgt bei ca. 56°C. Die Lösung (4 ml) wird auf dem Horizontal-tisch auf Glasplatten (5x5 cm) gleichmäßig verteilt. Nach dem Erstarren der Agarose wurden mittels einer Stanzschablone 6 Auftragstellen in die Gelschicht gestanzt. Den Kontakt mit den Puffertrögen stellten zwei Filterpapierstreifen (Schleicher-Schüll Nr.2043) her. Als Kammerpuffer diente Barbitalpuffer pH 8,6/0,024 mol. Um eine unerwünschte Querdiffusion zu vermeiden, wurde schon vor dem Beschicken der Auf-tragstellen der Gleichrichter eingeschaltet. Bei einer konstanten Stromstärke $I = 10 \text{ mA}$ und 80 V dau-erte die Elektrophorese mehr als 12 Stunden (Lang-zeitelektrophorese), für die Kurzzeitelektrophorese (ca.3 Std.) wurde ein Strom von $I = \text{konst.} = 20 \text{ mA}$ und 200 V eingestellt. Trocknen und Färben wie oben.

3.5. Folgende AG- und AK-Mengen wurden bei den verschie-denen Methoden angewandt:

Tab. II

	Ouchterlony- Doppeldiff. =====		monospez. IE =====	
	μ l AG	μ l AK	μ l AG	μ l AK
α_1 AT	+0/+5/+10 10 μ l	10	2	60
Inter α_1 Tryps.Inh.	+0/+5/+10 10 μ l	10	4 6	40 50
β -Lipoprotein	+0/+1/+2 20 μ l	10	6	50
α_2 Macroglobul.	+0/+5/+10 10 μ l	10	6	60
α_1 Chymotrypsin	+0/+5/+10 10 μ l	10	6	50
IGM	+0/+1/+2 15 μ l	10	10	60
K			6	60
Λ			6	60

Tab. IV

	Zweidimensionale IE =====		
	μ l AG	μ l AK _{total}	μ l AK/cm ²
α_1 AT	4	100	5
Inter α_1	6	75	3,75
β Lipo	8	200	10
α_2 Macro	4	75	3,75
α_1 Chymo	8	100	5
IGM	20	50	2,5

Tab. V

Elektroimmundiffusion n. Laurell

=====

	$\mu\text{l AG}$	$\mu\text{l AK}_{\text{total}}$	$\mu\text{l AK/cm}^2$
α_1 AT	$\frac{3\mu\text{l}}{+2/+3/+5}$	150	6
Inter α_1	$\frac{5\mu\text{l}/3\mu\text{l}}{+1}$	75	3
β -Lipo	$\frac{3\mu\text{l}}{+1/+2/+3}$	75	3
α_2 Macro	$\frac{3\mu\text{l}}{+1/+3/+5}$	75	3
α_1 Chymo	$\frac{5\mu\text{l}/3\mu\text{l}}{+1}$	150	6
IGM	$\frac{8\mu\text{l}/5\mu\text{l}/3\mu\text{l}}$	50	2
IGA	$\frac{3\mu\text{l}}{+5/+10/+20}$	50	2
K	$\frac{8/5/3\mu\text{l}}$	150	6
Λ	$\frac{8/5/3\mu\text{l}}$	150	6

Legende:

Die Angaben in Klammern geben die jeweiligen Verdünnungen an. Beispiel: (1+0/+5/+10)
10 ul

Das heißt: Die erste Plasmaprobe war unverdünnt, die zweite wurde mit 5 und die dritte Probe mit 10 Teilen physiologischer NaCl Lösung verdünnt. Von diesen drei Proben wurden jeweils 10 ul in den AG-Trog gefüllt. Angaben ohne + (8/5/3) sind Mengenangaben in ul.

- 4 Die möglichen Veränderungen der Immunpräzipitation nach UaP Behandlung.

Die unter II 3. 1-4 aufgeführten Immunpräzipitationsverfahren machen zwar Qualitäts- und Quantitätsunterschiede der Eiweiße vor und nach UaP Behandlung sichtbar, erlauben jedoch nicht eine exakte Beurteilung der Art der Veränderungen. Hierzu wären Untersuchungen der Struktur und der biologischen Funktion erforderlich. Die Zusammenschau der Resultate aller Methoden läßt lediglich Vermutungen zu, in welcher Weise das jeweilige Eiweiß von Plasmin verändert wurde. Dabei bieten sich hauptsächlich drei Erklärungen an:

1. Spaltung des Ursprungsmoleküls
2. Komplexbildung des Ursprungsmoleküls mit UaP
3. Aufschließen eines gefalteten Moleküls

- 4.1. Kommt es zu einer Spaltung des Ursprungsmoleküls, so können entweder gleichgroße oder verschiedengroße Bruchstücke entstehen, wodurch eine Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit verursacht werden kann.

Außer der Größe kann auch die Antigenität der Fragmente differieren. Die Spaltprodukte stehen mit dem Ursprungsmolekül in Antigengemeinschaft und werden deshalb vom gleichen Antikörper ausgefällt. Es können aber auch Spaltprodukte entstehen, die keine AG-Determinanten besitzen und deshalb mit Immunpräzipitationsmethoden nicht mehr nachzuweisen sind. Auch können sich die Ladungsverhältnisse der Bruchstücke gegenüber dem Muttermolekül geändert haben, was sich in der Elektrophorese in einer veränderten Wanderungsrichtung oder -geschwindigkeit niederschlägt.

- 4.2. Eine andere Folge der UaP Behandlung kann die Komplexbildung des Ursprungsmoleküls mit Plasmin sein, möglicherweise unter gleichzeitiger Absprengung eines Teils des Muttermoleküls. Eine derartige Plasmin-Koppelung kann demzufolge die Größe des Moleküls, und bzw. oder auch dessen elektrische Ladung verändern. Daraus resultiert dann, ebenso wie nach einer Spaltung, eine andere Wanderungsgeschwindigkeit und eine Änderung des elektrophoretischen Verhaltens. (9, 14)
- 4.3. Gelingt dem Plasmin das Aufschließen eines geknäuelten oder gefalteten Moleküls zu einer schmalen Molekülform, so wird dieses Molekül befähigt, schneller durch die Agarnetzmaschen zu diffundieren. Auch hier ist eine gleichzeitige Ladungsänderung oder Koppelung an UaP möglich, ebenso eine Absprengung eines Molekülteils. Durch das Aufschließen des Moleküls kann es zur Freilegung neuer AG-Determinanten

kommen und damit zur Erhöhung der Antigenität.

Da die verschiedenen Möglichkeiten der Eiweißveränderungen durch UaP auch miteinander kombiniert sein können, ist für die Präzipitationsmethoden bei den verschiedenen Proteinen kein einheitliches Bild zu erwarten. Eine eindeutige Zuordnung zu den strukturellen Veränderungen (Spaltung, Koppelung, Aufschlüsselung) ist daher nicht immer möglich.

III Ergebnisse

A Qualitative Tests

Bei den qualitativen Tests wurden dem Plasma in vitro hohe Plasminmengen (ca. 3000 E/ml) zugefügt. Folgende Eiweißfraktionen wurden untersucht:

1. α_1 -Antitrypsin (α_1 AT)
2. Inter α_1 -Trypsininhibitor (Inter α_1)
3. β -Lipoprotein (β -Lipo)
4. α_2 -Macroglobulin (α_2 -Macro)
5. α_1 Chymotrypsin (α_1 -Chymo)
6. Immunglobulin M (IGM)

Diese Proteine wurden mit den oben beschriebenen Methoden untersucht.

1. Die Abb. 1-4 zeigen die Ergebnisse für α_1 AT.

Die Auftragstellen mit Kreuz (⊗) enthalten UaP.



Abb. 1

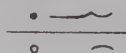


Abb. 2



Abb. 3a



b



Abb. 4

Während die Doppellinie nach Plasmin in der Ouchterlony-Methode in ihrer Ursache nicht sicher zu bestimmen ist, zeigt sich in der IE und Clark-Freeman-Methode, daß die elektrische Wanderungsgeschwindigkeit der veränderten Eiweiße abgenommen hat. Der kontinuierliche Übergang des Schweißs in das Hauptpräzipitat (Abb.2) verrät die Antigengemeinschaft, ebenso wie die Abb.3b. Als Ursache dieser unterschiedlichen Schnelligkeit kann eine Komplexbildung des Ursprungsmoleküls mit UaP vermutet werden. Die Zunahme des Proteingehalts, ersichtlich aus der stärkeren Anfärbbarkeit der Präzipitate (Abb.4), spricht ebenfalls für eine Veränderung im Sinne einer Koppelung. Das würde auch das doppelte Präzipitat der Ouchterlony-Technik erklären, das dem AG-Trog aufgrund der langsameren Diffusion näher liegt. (9,14).

2. Die für Inter α gefundenen Veränderungen (Abb.5-8) deuten dagegen eher auf eine Spaltung hin.

INTER α_1



Abb.5

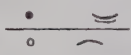


Abb.6



Abb.7a



b



Abb.8

Die Doppellinien der behandelten Proben sind in der Doppeldiffusion (Abb.5) im Gegensatz zum α_1 -AT weiter an den AK-Trog gerückt als die intakten Inter α Moleküle, das heißt, daß entweder die Bruchstückkonzentration größer ist als die der Ursprungs-

eiweiße oder die Fragmente aufgrund ihrer verminderten Größe schneller diffundieren können. Die Abb.6 und 7 bescheinigen den veränderten sowie den intakten Inter α Molekülen die gleiche elektrische Wanderungsgeschwindigkeit, denn die Präzipitate liegen übereinander. Auch hier scheint die Spaltproduktkonzentration die der unveränderten Moleküle zu übersteigen. Noch deutlicher macht das die Laurellmethode, denn daß nach UaP Behandlung die Zahl der intakten Inter α -Moleküle zunimmt, ist unmöglich. Eine Aufschlüsselung eines Teils der Inter α -Fraktion mit Freilegung neuer AG-Determinanten muß auch in Betracht gezogen werden. Aufgrund der höheren Antigenität würde das Präzipitationsoptimum erst später erreicht, die Proteine also später ausgefällt werden. Interessant ist bei der unbehandelten Probe in Abb.7a der sich anodenwärts anschließende Buckel. Entweder handelt es sich um in vivo komplexgebundenes Enzym oder um eine Heterogenität des Inter α , ähnlich wie beim β_1 AC.

3. Da für die β -Lipoproteine mit der Ouchterlony-Methode keine Veränderung nachzuweisen war, wurden stattdessen zwei Lipidelektrophoresen auf Agarosegel durchgeführt. Beide Versuche wurden mit verschiedenen Plasmen durchgeführt. Es fielen zwei gemeinsame Veränderungen auf (Tab.VI). Beide Male war nach UaP Behandlung der Albumingehalt angestiegen, während der β -Lipogehalt abgenommen hatte.

Tab. VI

% d.Eiw.frakt.	1.Versuch		2.Versuch	
	Kontr.	behand.	Kontr.	behand.
Albumin	45	63	71	78
α -Lipoprot.	11	8	3	5
Prä β -Lipoprot.	11	9	3	4
β -Lipoprot.	33	20	14	11
Chylom.	-	-	9	2

Auch die anderen Methoden (Abb.9-11) ergaben Veränderungen nach UaP.

β -LIPO

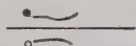


Abb. 9



Abb. 10a



b



Abb. 11

In Abb.9 und 10 waren die veränderten Lipoproteine langsamer gewandert als die intakten Moleküle. Da die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten sich in der Laurellmethode (Abb.11) nicht auswirken können, muß die Erklärung für die Präzipitativverlängerung anderswo gesucht werden. Möglicherweise legt das Plasmin neue AG-Determinanten frei, wodurch eine scheinbare Zunahme von Einzelmolekülen vorgetäuscht wird. Ein Zusammenfallen und Potenzieren der Präzipitate von β -Lipo und dessen veränderten Molekülen wird in den anderen Methoden durch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit verhindert. (Abb.10b)

4. α_2 MACRO



Abb. 12



Abb. 13



Abb. 14a



b



Abb. 15

Die behandelten α_2 Macroglobuline waren in der Ouchterlony-Methode (Abb.12) weniger weit zum AK-Trog gewandert, was auf eine Konzentrationsabnahme oder eine Vergrößerung des Moleküls hinweisen könnte. Die elektrische Wanderungsgeschwindigkeit dagegen (Abb.13) hatte zugenommen, demnach müßte die Molekülgröße ab- oder die Zahl der negativen Ladungen zugenommen haben. Da ein Teil der α_2 Macroglobuline im elektrischen Feld schneller wandert, erklärt sich auch die Basisverbreiterung der zweidimensionalen IE (Abb.14a,b). Die größere Streckung in der 1.Dimension hat neben der Basisverbreiterung auch eine Höhenabnahme des Präzipitates zur Folge. Die kürzeren und stärker gefärbten Peaks in Abb.15 sprechen weniger für eine Konzentrationsabnahme von α_2 Macro, das würde die offensichtliche Zunahme des Proteingehalts nicht erklären, sondern eher für eine Koppelung an UaP (stärkeres Präzipitat) mit gleichzeitiger Blockade einiger AG-Determinanten ($\rightarrow$ Peakverkürzung). Im Gegensatz zum α_1 AT jedoch, wo ein Teil der Proteine wahrscheinlich unverändert geblieben war, sind hier möglicherweise alle α_2 Macro-Moleküle in gleicher Weise verändert worden, so daß bei diesen Methoden wieder eine einheitliche Proteinfraktion nachgewiesen wird. ($\rightarrow$ Fehlen von Doppellinien und -höckern)

5. α_1 CHYMO



Abb.16



Abb.17



Abb.18a



b



Abb.19

Hier sind die Verhältnisse ähnlich wie bei der Inter α_1 Fraktion. Die Ouchterlony- und Laurellmethode geben Aufschluß darüber, daß nach UaP Behandlung zwei unterschiedliche Proteine nachzuweisen sind (Doppel-
linien), die vom gleichen Antiserum ausgefällt werden. Die eine Gruppe sind die intakten, die andere die ver-
änderten α_1 -Chymotrypsinmoleküle. Eine Aufschließung
des Moleküls mit Freilegung antigener Determinanten
kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen
werden, sonst müßte die damit verbundene Antigenitäts-
erhöhung eine Konzentrationszunahme vorgetäuscht haben.
Das ist jedoch nicht der Fall (Abb.16,17,18). Die Frage,
ob es sich um eine Spaltung oder eine Koppelung an
Plasmin mit Blockade einzelner AG-Determinanten handelt,
kann anhand der vier Resultate nicht entschieden werden.

6. IGM



Abb. 20

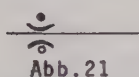


Abb. 21



Abb. 22a



b



Abb. 23

Alle vier Präzipitationsverfahren zeigen Veränderungen
für IGM nach Plasminbehandlung. Die elektrische Wan-
derungsgeschwindigkeit schien sich nicht verändert zu
haben, dagegen aber die IGM-Konzentration (Abb.22,23).
IGM liegt als Pentamer von je 5 Paaren leichter und
schwerer Ketten vor. Möglicherweise hat das Plasmin
schwere Ketten (H-Ketten) des Immunglobulins abge-
sprengt (leichte Ketten werden vom H-Kettenspezifischen
IGM Antiserum nicht ausgefällt) oder lediglich neue

AG-Determinanten durch Aufschließen des Globulins freigelegt. Daß auch leichte Ketten (L-Ketten) durch die UaP Behandlung abgespalten oder freigelegt wurden, zeigen die Abb.24 und 25, in denen mit den L-Ketten-spezifischen Antiseren Anti-K und Anti- Λ gearbeitet wurde.

K

Λ



Abb.24



Abb.25

Durch die Absprengung oder Freilegung der L-Ketten kann es ebenfalls zur AG-Determinantenfreilegung am IGM Molekül gekommen sein. Die dargestellten L-Ketten sind wahrscheinlich nicht nur der IGM Fraktion, sondern allen drei Immunglobulinklassen zuzuordnen.

III Ergebnisse

B Quantitative Tests

In dieser Versuchsreihe sollte ermittelt werden, wie hoch eine Plasmindosierung mindestens sein muß, um Veränderungen der Plasmaeiweiße zu bewirken. Mit Ausnahme der Ouchterlony Doppeldiffusion wurden wieder die gleichen Immunpräzipitationsverfahren verwandt. Die Berechnung der 3 verschiedenen UaP Dosierungen (A,B,C) wurde, wie unter II 1-2 beschrieben, durchgeführt.

Untersucht wurden wieder die Proteine:

1. α_1 Antitrypsin
2. Inter α_1 Trypsininhibit
3. β -Lipoprotein
4. α_2 Macroglobulin
5. α_1 Chymotrypsin
6. IGM

1. Die Ergebnisse der qualitativen Versuche für α_1 -Antitrypsin wurden bestätigt.

α_1 AT

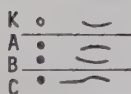


Abb. 26

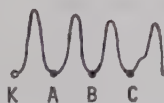


Abb. 27



Abb. 28

Die jeweiligen C-Präzipitate entsprachen dabei

am meisten den Ergebnissen der Vorversuche. Aber auch die Proben A und B wiesen Veränderungen auf, die mit steigender Plasmindosierung deutlicher wurden. In der Clark-Freeman-Methode wurde das Kontroll-Plasma K sowie die Proben A und B auf dasselbe Diaglas aufgetragen, um die Präzipitate besser vergleichen zu können. Die Probe C wurde aus Platzgründen gesondert untersucht. Die zunächst paradox erscheinende Peakverlängerung von B gegenüber den beiden anderen behandelten Proben erklärt sich möglicherweise durch eine Zunahme an Antigendeterminanten. Wie aus Abb.27 ersichtlich, waren bei B deutlichere Hinweise auf Reaktionsprodukte zu erkennen als in A, so daß die Reaktionsprodukte den größeren Peak in der Laurelltechnik verursacht haben könnten. Bei C hatte die α_1 AT-Konzentration möglicherweise schon so stark abgenommen, daß sie auch mit dem zusätzlichen Präzipitat der Reaktionsprodukte die Peaklänge von B nicht erreichen konnte.

2. INTER α_1

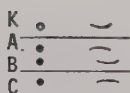


Abb.29

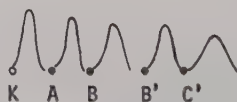


Abb.30a

b



Abb.31

Während IE und Laurelltechnik für Inter α_1 zwischen Kontrolle und Probe A keinen Unterschied deutlich machen, zeigt die empfindlicher auf Qualitätsunterschiede reagierende zweidimensionale

IE Veränderungen nach der niedrigsten Plasmin-
dosierung auf. Bei den Proben B und C fällt die
Ähnlichkeit mit den Vorversuchen auf, in Abb.29
die zunehmende elektrische Wanderungsgeschwindig-
keit, in Abb.30 die Basisverbreiterung und in
Abb.31 der Doppelpeak.

3. β -LIPO

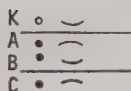


Abb.32



Abb.33



Abb.34

Die zweidimensionale IE (Abb.33) und die Laurell-
technik (Abb.34) zeigen, daß auch β -Lipo schon
von 15 E UaP/kg angegriffen wird. Mit zunehmender
UaP Dosierung nimmt auch hier die Ähnlichkeit mit
dem entsprechenden Vorversuch zu (z.B. Doppelhöcker
in Abb.33). In Abb.34 fällt bei Probe A noch eine
Konzentrationsabnahme auf. Hier sind noch nicht
genügend Spaltprodukte entstanden oder AG-Deter-
minanten freigelegt, um einen β -Lipo-Konzentrations-
anstieg vorzutäuschen wie in C. 150 E scheinen je-
doch zu genügen, um gerade so viele Reaktionspro-
dukte entstehen zu lassen, daß sie eine Peakver-
kürzung durch β -Lipo-Abnahme kompensieren.

4. α_2 MACRO

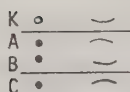


Abb.35

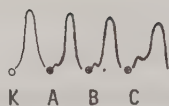


Abb.36



Abb.37

α_2 Macro ist, wie die Abb.36 und 37 deutlich zeigen, schon von der niedrigsten UaP Dosierung angegriffen worden. Ein Vergleich der Abb.36 mit der entsprechenden zweidimensionalen IE der qualitativen Testserie (Abb.14) erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich, denn in Abb.14 fällt lediglich eine Basisverbreiterung und Präzipitatverstärkung auf, ein Doppelhöcker wie in Abb.3 fehlt jedoch. Die Erklärung dafür scheint in der unterschiedlichen UaP Dosierung zu liegen. Die Proben der Vorversuche wurden mit soviel Plasmin behandelt, daß alles α_2 Macro angegriffen und verändert wurde, während die vergleichsweise niedrigen UaP Mengen der quantitativen Tests nur einen kleinen Teil der α_2 Macroglobuline angegriffen haben. Übereinstimmung herrscht in der Zunahme der Präzipitatstärke.

5. α_1 CHYMO

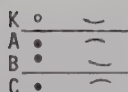


Abb.38

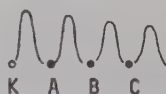


Abb.39



Abb.40

Für α_1 Chymotrypsin bestätigte sich die nach Behandlung zunehmende elektrische Wanderungsgeschwindigkeit (Abb.38 C), ebenso die Abnahme der Präzipitathöhe in der Clark-Freeman- und Laurellmethode (Abb.39,40), die schon bei der niedrigen A-Dosierung auffällt. Die Konzentration der veränderten α_1 Chymotrypsinmoleküle ist aber erst in C so groß, daß sie in der Laurelltechnik einen Doppelpeak bilden kann (Abb.40 C)

6.

IGM

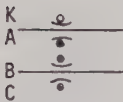


Abb.41



Abb.42

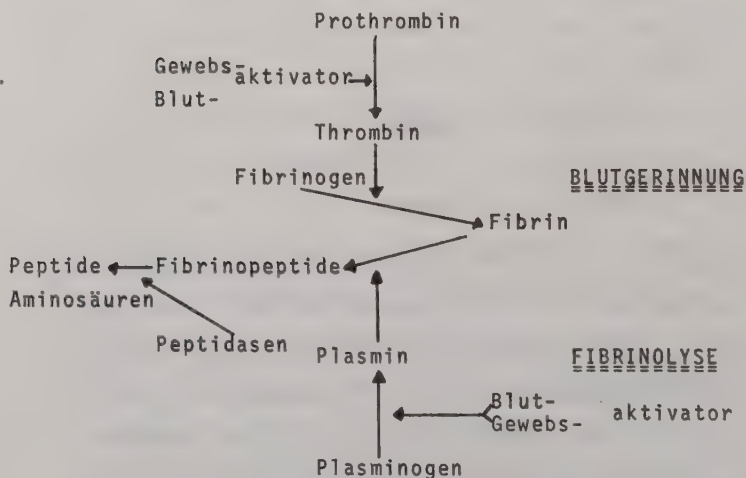
Da ein Teil der IGM Fraktion bei den vorgegebenen Bedingungen auch kathodenwärts wandert, wurde auf die zweidimensionale IE verzichtet. Anhand der Laurellmethode (Abb.42) läßt sich ablesen, daß auch die IGM Moleküle von der kleinsten Plasmin-dosierung angegriffen wurden (längerer Peak, schwächeres Präzipitat). Auch in der IE ist durch den zunehmend kürzeren Präzipitat-Rillen-Abstand ein Konzentrationsanstieg angedeutet, der sich durch die oben diskutierte Aufschließung des Globulins mit AG-Determinantenfreilegung erklären würde (III A,6).

III Ergebnisse

C Die Bedeutung von Plasmin im Blutgerinnungs- und Fibrinolyse-System sowie die Wirkung von Plasmin auf Fibrin und Fibrinogen.

Die unter III A und B beschriebenen Versuche beschäftigten sich mit den unspezifischen Wirkungen von UaP auf verschiedene Serumeiweiße. Die Bedeutung von Plasmin im System der Blutgerinnung und Fibrinolyse veranschaulicht Schema 1 (13):

Schema 1.
(13)

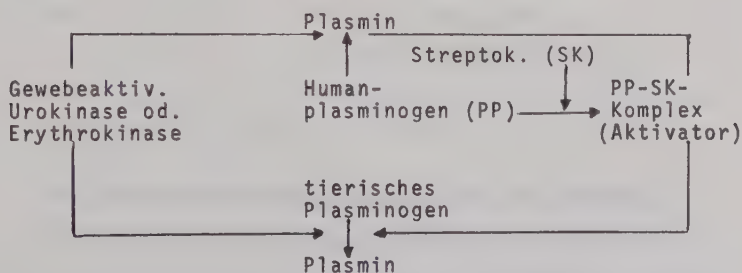


1. Bei der Aktivierung des fibrinolytischen Systems unterscheidet man 3 Prinzipien (13):
 - 1.1. Körpereigene Aktivatoren können durch direkte Einphasenaktivierung des Proenzyms Plasminogen die Fibrinolyse in Gang setzen. Man unterscheidet organgebundene- oder Gewebeaktivatoren und Blut- oder Serumaktivatoren. Ein hoher Gewebeaktivator-

gehalt ist beispielsweise im Uterus anzutreffen, wo es auf eine gute Liquidität des Blutes ankommt, in diesem Fall also auf das Flüssigbleiben oder die Wiederverflüssigung des Menstrualblutes. In den Körperflüssigkeiten, die kapilläre, verschlußgefährdete Röhrensysteme durchfließen, findet man hohe Aktivorkonzentrationen (Urin, Sperma, Muttermilch).

- 1.2. Streptokinase vermag über eine Zweiphasenreaktion, bei der als Intermediärprodukt ein Aktivator entsteht, das fibrinolytische System zu aktivieren. Streptokinase verbindet sich dabei mit Humanplasminogen oder auch Proaktivatorplasminogen (PP) zu einem Komplex, der wie die natürlichen Aktivatoren Plasminogen in Plasmin umzuwandeln vermag (Schema 2). Bemerkenswert ist, daß tierisches Plasminogen mit Streptokinase keinen Aktivator bilden kann. (2,13)

Schema 2.
(13)



- 1.3. Derivate der Salizyl- und Nikotinsäure sowie Heparin vermögen in vivo über weitgehend unbekannte Mechanismen (Mobilisierung endogener Faktoren) die Fibrinolyse indirekt zu stimulieren.

2. Doch nicht nur die Aktivierung, sondern auch die Inhibition der Fibrinolyse ist von Bedeutung. Das Humanserum verfügt insgesamt über 4 Plasmininhibitoren (α_1 Antitrypsin, Antithrombin III, C₁Inaktivator und α_2 Macroglobulin), von denen α_1 Antitrypsin das wichtigste Antiplasmin darstellt, das das Plasmin irreversibel nach Art eines Progressivinhibitors inaktiviert. Die Plasmininhibitoren, die im Blut in 30fachem Überschuß vorkommen, haben die Aufgabe, ein Übergreifen der Lysis auf andere Plasmaproteine als Fibrin zu verhindern (13, 23). Zwei der Plasmininhibitoren, α_2 Macroglobulin und Antithrombin III, haben außerdem auch Antithrombinwirkung und stellen dadurch einen wichtigen kompensatorischen Regulationsmechanismus zwischen Gerinnung und Fibrinolyse dar. Wenn ein Teil dieser beiden Eiweiße z.B. bei einer vermehrten Thrombinbildung verbraucht wird, sinkt damit gleichzeitig die Antiplasminkapazität. Das hat eine Steigerung der Fibrinolyse zur Folge.

3. Wirkung von Plasmin auf Fibrin und Fibrinogen.

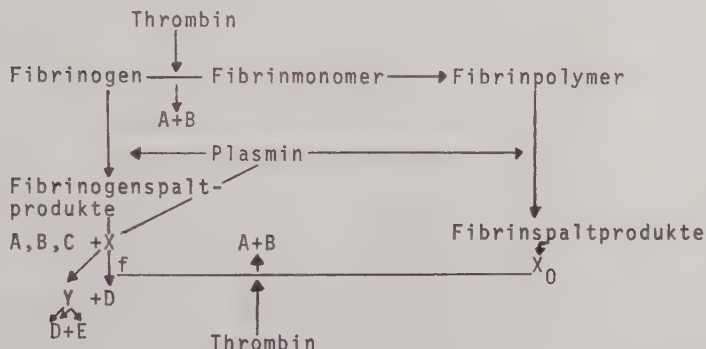
Die dritte Versuchsreihe befaßte sich mit der Wirkung von Plasmin auf Fibrin und Fibrinogen.

Allgemeines:

Bei der Gerinnung entsteht aus Fibrinogen (Molekulargewicht 340.000) unter dem Einfluß des proteolytischen Enzyms Thrombin, das die Fibrinopeptide A und B (je 50.000 Mol.gew.) abspaltet, das monomere Fibrin. Dieses vermag zu einem stabilen

Fibrinnetz zu polymerisieren (4). Das Schema 3 zeigt den Fibrin- und Fibrinogenabbau, deren Bruchstücke sich in etwa entsprechen (4).

Schema 3.
(4)



Plasmin spaltet aus dem Fibrinogenursprungsmolekül das großmolekulare Fragment X_f (Mol. gew. 240.000) und die kleinmolekularen Bruchstücke A, B und C. Das Fragment X_f kann in ein Y- (Mol. gew. 155.000) und ein D-Spaltprodukt (Mol. gew. 83.000) übergeführt werden. Bei weiter anhaltender Plasminwirkung wird das Fragment Y in ein E- (50.000) und ein zweites D-Bruchstück gespalten. Die Spaltprodukte D und E können durch Plasmin nicht mehr weiter gespalten werden.

Da Fibrin aus Fibrinogen unter Abspaltung der Fibrinopeptide A und B entsteht, unterscheidet sich das bei Fibrin zuerst abgespaltene Fragment X (als X_0 bezeichnet) strukturell vom Fragment X des Fibrinogenabbaus (X_f).

Dadurch, daß Plasmin neben Fibrin auch Fibrinogen spaltet, wird das Gerinnungssystem in zweifacher Weise gehemmt, einmal durch die entstehenden

Spaltprodukte, die ab einer Mindestkonzentration von 60 $\mu\text{g/ml}$ die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin hemmen und deshalb auch als Antithrombin VI bezeichnet werden, zum anderen durch die Abnahme der Fibrinogenkonzentration im Blut. (4,19)

Die Fibrinogenspaltung in der Immunelektrophorese.

- 3.1. Es wurde zunächst mit Hilfe der monospezifischen IE (II, 2) das elektrophoretische Verhalten von Fibrinogen mit und ohne UaP untersucht. Mit der IE sollte gezeigt werden, ob und wie sich die Fibrinogen-, D- und E-Präzipitate unterscheiden. Für ein normales, nicht mit Plasmin behandeltes Plasma waren keine Unterschiede festzustellen; obwohl die beiden Fibrinogenspaltprodukte nicht oder nur in Spuren im Plasma vorkommen, waren die Präzipitate ziemlich gleich ausgefallen. Das ist mit der Antigengemeinschaft zu erklären, die die Bruchstücke D und E mit dem Ursprungsmolekül Fibrinogen haben. Das Anti D- und Anti E-Serum reagiert nicht nur mit den Spaltprodukten, sondern auch mit den Fibrinogenmolekülen. (Abb.43)

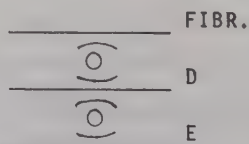
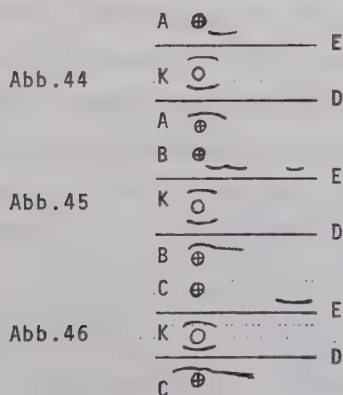


Abb.43

Abb.43

Um speziell über die Lage der D- und E-Präzipitate Aufschluß zu erhalten, wurden Plasmaproben mit 15, 150 und 15000 E UaP/kg KG behandelt. Die Abb. 44-46 zeigen deutlich, daß bei unbehandeltem Plasma die Antiseren D und E nur das elektrophoretisch träge Fibrinogen ausfällen (jeweils mittlere Auftragestelle). Während dieses nämlich zentral bei der Plasmaauftragstelle präzipitiert, wandern die durch UaP Behandlung völlig abgespaltenen E-Bruchstücke zur Anode. Die D-Fragmente sind nicht so eindeutig zu bestimmen, da das Antiserum auch noch andere Fibrinogenspaltprodukte (γ , X_f) ausfällt, an denen D lokalisiert ist. Veränderungen, die mit der Höhe der UaP Dosis zunehmen, sind jedoch deutlich festzustellen. Während bei 150 E/kg KG noch keine vollständige Fibrinogenspaltung erfolgt ist, nur ein dünnes E-Präzipitat und ein etwas anodenwärts verschobenes Fibrinogen, ist bei 1500 E/kg KG die Spaltung fast komplett, denn das Anti E-Serum fällt kein Fibrinogen mehr aus und liefert weit anodenwärts auf dem Objektträger ein kräftiges und einheitliches E-Präzipitat.



3.2. In der zweidimensionalen IE wurde ein Kontrollplasma mit zwei behandelten Plasmen (15 und 150 E) verglichen. Die Plasmen wurden vor dem Auftragen carbamylisiert, um eine einheitliche Anodenwanderung zu gewährleisten und die Elektroendosmose zu verhindern. Abb.47 zeigt, daß die unbehandelte Probe im antifibrinogenserumhaltigen Agargel einen Doppelhöcker erzeugt, dessen höherer Buckel wahrscheinlich dem Fibrinogen entspricht, während das vorangehende kleinere Präzipitat das D-Fragment darstellen könnte. Dieses nimmt unter UaP-Behandlung an Konzentration zu, so daß das erste Präzipitat wächst und der Doppelhöcker verschwindet. Allerdings kann die leichte Oberhöhung auf der linken Seite der Präzipitatspitze einen Doppelpeak andeuten. Das würde bedeuten, daß die Fibrinogenmenge durch die Spaltung gesunken, die Spaltproduktkonzentration (hier Fragment D) demzufolge gestiegen ist. Bei 150 E hat die Peaklänge stark zugenommen, jedoch erscheint das Präzipitat, besonders die Spitze, stark verwaschen. Dies ließe sich durch die Zunahme des für das Antifibrinogenserum weniger spezifischen D-Antigens erklären. Ein zweites ganz schwaches und leicht anodenwärts gerücktes Präzipitat ist möglicherweise einem anderen Fragment zuzuordnen. Ähnliche diffuse Präzipitate sind auch bei der IE zu sehen. (Abb.46)



Abb.47

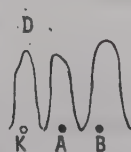


Abb.48

Der gleiche Versuch mit Anti-D als Antikörper ergab ein ähnliches Präzipitatbild (Abb.48). Da das Anti-D Serum, wie oben erwähnt, auch Fibrinogen ausfällt, ergibt die Kontrolle ebenfalls einen leichten Doppelbuckel mit höherer Spitze auf der rechten Seite (Fibrinogen), während die 15 E Probe analog zum vorigen Versuch eine nach links (D-Fragment) verschobene Spitze hat. Bei 150 E ergibt sich im Gegensatz zum vorigen Versuch ein scharfes Präzipitat, da das Antiserum D-spezifisch ist.

- 3.3. Für die Laurellmethode wurden die Plasmaproben (Kontrolle, 15, 150, 1500 E) teilweise mit Thrombin zur Gerinnung gebracht, um so Fibrinogen- und Bruchstückpräzipitate voneinander zu trennen und störende Interferenzen zu vermeiden. Bei der unbehandelten Kontrolle und der 15 E Probe trat sofort nach Topostasinzugabe die Gerinnung ein, bei 150 und 1500 E war keine sichtbare Gerinnung festzustellen, eine Folge des Fibrinogenverbrauchs durch die hohe Plasmindosierung. Die Abb.49 und 50 zeigen deutlich, daß das Anti-D Serum aus den ersten vier Antigen-trägern das Fibrinogen aber nicht D-Fragment ausgefällt hat, denn nach der Gerinnung, d.h. der Beseitigung des Fibrinogens sind keine Präzipitate mehr zu sehen außer bei den mit 150 und 1500 E behandelten Proben.

D

defibr.



Abb. 49



Abb. 50

Hier ist durch die hohe Plasmindosierung eine stärkere Fibrinogenspaltung und damit eine höhere Bruchstückkonzentration verursacht worden.

Allerdings haben diese beiden Peaks an Höhe gegenüber den entsprechenden Präzipitaten der nicht defibrinierten Proben verloren, denn vorher hatte das Fibrinogen eine größere D-Konzentration vorgetauscht.

Die Resultate für das Fragment E waren analog den oben beschriebenen Ergebnissen. (Abb. 51 und 52)

E

defibr.



Abb. 51



Abb. 52

4. Unterschied des Wirkungsgrades von Plasmin auf Fibrin und Fibrinogen.

Normalerweise enthält das Blut nur Fibrinogen und kein oder nur Spuren von Fibrin. Kommt es aus irgendeinem Grund zur Verschiebung des Gleichgewichtes im Gerinnungssystem und damit zum Auftreten von Fibringerinnseln im Blut (Verschlußkrankheit), ist es wichtig zu wissen, auf welches der beiden

Proteine, Fibrinogen oder Fibrin, das UaP eine größere Wirkung hat. Deshalb wurden die Substrate der UaP-Wirkung auf Fibrin und Fibrinogen, nämlich die Konzentration ihrer Spaltprodukte, auf Unterschiede untersucht.

Zu diesem Zweck wurde eine Plasmaprobe mit 150 E UaP/kg KG versetzt und sofort zur Gerinnung gebracht, d.h. sämtliches vorhandene Fibrinogen in Fibrin umgewandelt. Eine zweite behandelte Probe wurde nicht zur Gerinnung gebracht, sie enthielt also nur Fibrinogen. Nachdem beide Proben 2 1/2 Std bei 37°C im Brutschrank inkubiert waren, wurden sie mittels der monospezifischen IE auf Fibrinogen-spaltprodukte (D und E) untersucht.

Abb.53 zeigt, daß das Plasmin das Fibrin der geronnenen Probe (a) stärker angegriffen hat als das Fibrinogen der zweiten Probe (b), denn auf der einen Seite ist nur ein stark anodenwärts gewander-tes E-Präzipitat zu sehen, während das Präzipitat der nicht geronnenen Plasmaprobe nicht so weit gelaufen ist und zudem einen bis zur Auftragstelle reichenden Schweif aufweist.



Abb.53

Auch die IE mit Anti-D Serum zeigt deutlich einen Unterschied der Präzipitate von geronnenen und nicht geronnenen Plasma. Die geronnene Probe (a) hinter-

ließ ein nur wenig anodenwärts gewandertes D-Präzipitat, während die andere Probe (b) neben dem D-Präzipitat einen anodenwärts gerichteten Schweif hatte, der möglicherweise den X_f und bzw. oder Y-Fragmenten zuzuordnen ist (Abb.54). Auch diese IE zeigt, daß das Fibrin ganz, das Fibrinogen offensichtlich nicht vollständig gespalten wurde.

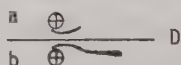


Abb.54

5. Plasminogenbestimmung bei Frühgeborenen

Schon in der Einleitung war auf die niedrigen Plasminogenwerte Neu- und Frühgeborener hingewiesen worden (1,17,23). Eigene Untersuchungen konnten dies bestätigen. Untersucht wurde das Plasma eines 1000g Frühgeborenen, das kurz nach der Geburt starb, sowie das Plasma eines anderen Frühgeborenen, das überlebte. Als Kontrolle diente wieder Normalplasma.

Um bessere Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurde jeweils 5 und 3 μ l Plasma aufgetragen. Der Plasminogenwert des 1000g Frühgeborenen lag ungefähr bei 20-25% des Erwachsenen-Normalwertes, der des anderen Kindes etwa bei 40-50% (Abb.55)



Abb.55

1+2	Normalplasma (8+5 μ l)
3+4	1000g Frühgeb. (5+3 μ l)
5+6	Frühgeborenes, das überlebte (5+3 μ l)

IV D i s k u s s i o n

Wie die in vitro Versuche zeigen, verändert schon die Behandlung mit minimalen UaP Dosen (umgerechnet 15 E/kg KG) die immunelektrophoretischen Eigenschaften der untersuchten Macroglobuline und Trypsin-inhibitoren. Die Tatsache, daß neben den Plasmin-inhibitoren α_1 Antitrypsin und α_2 Macroglobulin auch noch die Proteine Inter α_1 Trypsininhibitor, Antichymotrypsin, β -Lipoprotein und IGM angegriffen wurden, zeigt, daß schon bei 15 E UaP die Plasmininhibitoren ein Übergreifen der Lysis auf andere Plasmaproteine als Fibrin nicht mehr verhindern können. Deshalb sollte die Frage, ob mit Urokinase bzw. Streptokinase oder mit UaP therapiert werden soll, eingehend geprüft werden.

Inhalationen mit UaP, wie z.B. von Ambrus (1) beschrieben wurden, können möglicherweise durch eine Schwächung der Trypsininhibitoren und anderer Inhibitoren zur Autolyse des Lungengewebes führen, denn die beim Leukozytenzerfall freiwerdenden Proteasen und Bakterienproteasen könnten nicht oder nur teilweise inaktiviert werden (14, 15, 16). Es könnte sich bei länger dauernder Therapie ein Lungenemphysem oder Bronchiektasen entwickeln, wie es auch bei Antitrypsinmangel beschrieben wird (18,26).

Die Veränderungen der Macroglobuline könnten sich dagegen beim Mukoviszidosekranken vorteilhaft

auswirken, da damit unter Umständen der von Spock u. Mitarbeitern (21) gefundene Hemmfaktor inaktiviert oder abgeschwächt werden könnte, der beim Kaninchen die synchrone Trachealzilienbewegung hemmt. Ob durch eine UaP Behandlung die klinische Symptomatik der Muskoviszidose abgeschwächt werden kann, müßte durch gezielte in vivo Versuche nachgewiesen werden.

Es konnte ferner gezeigt werden, daß die fibrinolytische Wirkung von UaP schon bei der kleinsten Dosierung (= 15 E/kg KG) einsetzt und daß Fibrin stärker angegriffen wird als Fibrinogen.

Außerdem konnte die Aussage von Karitzky und Künzer über den niedrigen Plasminogenspiegel bei Frühgeborenen bestätigt werden. Deshalb sollte bei Atemnotsyndrom und thromboembolischen Prozessen, die mit Plasminogenmangel kombiniert sind, UaP der Vorzug vor Urokinase und Streptokinase gegeben werden, um so die geringen körpereigenen Plasminogen-vorräte nicht zu erschöpfen, wodurch jede weitere Urokinase- bzw. Streptokinasegabe zwecklos würde.(1) Neuerdings wird beim Atemnotsyndrom eine Plasminogensubstitution empfohlen. Es bleibt abzuwarten, ob wegen des vermuteten Fehlens von Plasminogen-aktivator diese Maßnahme nützt. Bei Streptokinase-unverträglichkeit (allerg.Schock, hoher ASK Titer, wiederholte Anwendung) muß ebenfalls auf das weniger leicht erhältliche UaP ausgewichen werden.

Ein weiterer Anwendungsbereich für Urokinase und Plasmin ist die disseminierte intravasale Gerinnung. J. Suschke und Mitarbeiter konnten zeigen, daß es nach therapeutischen Gaben von Heparin zu einem signifikanten Abfall der Thrombozytenadhäsivität und gleichzeitiger Verlängerung der subaqualen Blutungszeit kommt, nach therapeutischen Dosen von Urokinase und UaP hingegen die Thrombozytenadhäsivität und die subaquale Blutungszeit unverändert bleiben (24). Harly R. Powell schlägt als optimale Therapie bei diss. intravas. Gerinnung die Kombination von Streptokinase, Heparin und Aspirin vor, die sich bei einer vergleichenden Untersuchung der symptomatischen Therapie und der Heparinbehandlung überlegen zeigte. (12) Um zu prüfen, ob eine fibrinolytische Therapie Erfolg hat bzw. eine ausreichend hohe Dosierung gewählt wurde, kann man eine Fibrinogenbruchstückbestimmung durchführen. (7)

V Z u s a m m e n f a s s u n g

Urokinase-aktiviertes Plasmin (UaP) bewirkt bei in vitro Versuchen außer einer Fibrinolyse Veränderungen an folgenden Proteinen: 1. α_1 Antitrypsin, 2. Inter α_1 Trypsininhibitor, 3. β -Lipoprotein, 4. α_2 Macroglobulin, 5. α_1 Chymotrypsin, 6. IGM. Diese Veränderungen konnten mit Hilfe verschiedener Immunpräzipitationsverfahren deutlich gemacht werden.

Nebenwirkungen: Vor- und Nachteile

Die Veränderung der Trypsininhibitoren kann möglicherweise zu einem Überwiegen der Proteasen und somit zu einer Andauung des Gewebes führen. Bei Mukoviszidosekranken könnte sich jedoch die Veränderung der Macroglobuline unter Umständen günstig auswirken, da Spock u. Mitarbeiter in der Macroglobulinfraktion einen Hemmfaktor entdeckt haben, der in der Pathogenese der Mukoviszidose eine große Rolle spielen könnte.

Fibrinolytische Hauptwirkung: Indikationen

Die UaP Therapie hat bisher ihre bevorzugte Anwendung bei thromboembolischen Geschehen, die mit Plasminogenmangel einhergehen und beim gleichfalls mit stark erniedrigten Plasminogenwerten verbundenen Atemnotsyndrom Frühgeborener. Neuerdings findet die fibrinolytische Therapie auch bei der disseminierten intravasalen Gerinnung Anwendung, sei es allein oder in Kombination mit Heparin und Aspirin.

UaP hat, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, in einigen Bereichen eindeutig den Vorrang vor anderen indirekten Fibrinolytika, andererseits verändert es in vitro schon in therapeutischen

Gaben die oben aufgeführten Proteine. Inwiefern diese Resultate auf eine in vivo Behandlung übertragbar sind, ist ebenso noch zu klären, wie die Frage, ob außer den 6 untersuchten Eiweißfraktionen auch noch andere Proteine von UaP angegriffen und verändert werden.

L I T E R A T U R

1. Ambrus, C. M. u. Mitarb. : Studies on Hyaline Membrane Disease III . Therapeutic Trial of Urokinase-Activated Human Plasmin
Pediatrics 38 Nr. 2, Part 1 (1966)
2. Anderson, A.J. : Quantitative estimation of urokinase and bacterial plasminogen activators using a fibrin substrate formed from plasminogen-free fibrinogen
Biochim.Biophys. Acta, 74 554-557 (1963)
3. Arnesen, H. u. Fagerhol, M.F. : α_2 Macroglobulin α_1 Antitrypsin and Antithrombin III in Plasma and Serum during Fibrinolytic Therapy with Urokinase
Scand. J. clin. Lab. Invest. 29, 259-263 (1972)
4. Barthels, M., Poliwoda, H. : Fibrinogen-Spaltprodukte
Gelbe Hefte 12. Jahrg., 4 184-189 (1972)
5. Behringwerke, Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik
Heft 3 (Juli 1971)
6. Behringwerke: Methoden der qualitativen und quantitativen Immunelektrophorese
7. Das, P.C. u. Mitarb. : Fibrin Degradation Products in Sera of Normal Subjects
Brit. Med. J. 4 718-720 (1967)
8. Fischer, M., Pilgerstofer, H.W.: Urokinase "Green Cross", eine neue Urokinasepräparation
Int. J. clin. Pharmacol. 22, 142-149 (1969)
9. Ganrot, P.O. : Crossed Immunelectrophoresis
Scand. J. clin. Lab. Invest. 26 suppl. 124, 39-41 (1972)
10. Genton, E., Wolf, P.S.: Urokinase Therapy in Pulmonary Thromboembolism
Am. Heart J. 76 Nr 628-637 (1968)

11. Green Cross Corporation: Specification on Fibrinolysin - Green Cross (1966)
12. Harley, R., Powell u.a. : Streptokinase and anti-thrombotic therapy in the hemolytic-uremic-Syndrome
The journal of Pediatrics 345 (1974)
13. Heimbürger, N., Trobisch, H.: Blutgerinnung und Fibrinolyse
Angew. Chem. 83 Nr. 3 89-120 (1971)
14. Hochstrasser, K., Heimbürger, N.: Nachweis und quantitative Bestimmung von Komplexen zwischen Leukozytenproteasen und α_1 Antitrypsin in Körpersekreten und Körperflüssigkeiten
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie Bd 353, S 1120-1124 (1972)
15. Hochstrasser, K., Hochgesand, J. u. Rasche, B.: Zur Frage der gleichzeitig vorhandenen proteolytischen und antiproteolytischen Aktivität im Sputum bei obstruktiven Atemwegserkrankungen
Respiration 31 : 343-349 (1974)
16. Hochstrasser, K., Werle, E.: Isolierung und Charakterisierung eines Proteinaseinhibitors aus menschlichem Bronchialsekret
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie Bd 353, S 221-226 (1972)
17. Karitzky, D., Künzer, W.: Zur Fibrinolyse beim Atemnotsyndrom
Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) Vol.24 Nr.1/2 (1970)
18. Laurell, C.B., Eriksson, S.: The electrophoretic α_1 globulin pattern of serum in α_1 antitrypsin deficiency
Scand. J. clin.Lab.Invest. 15 132 (1963)
19. Minn, Sang K., Mandel, E.E.: The Use of Laboratory Determinations in the Control of Streptokinase Therapy A.J.C.P. 58 415-421 (1972)

20. Ploug, J., Kjeldgaard, N.O.: Urokinase an activator of plasminogen from human urine
Biochim. Biophys. Acta 24 278-282 (1957)
21. Rossi, E., Gugler, E.: Moderne Gesichtspunkte zur Pathogenese der Mucoviscidose (2. Dt. Symposium)
Mucoviscidose Thieme Verl. S. 9 (1968)
22. Satake, K. u. Mitarb.: The Effect of Urokinase on Cerebral Thrombosis
32nd Conference of the Japan. Society of Circulatory Organs Kurume (Japan) (1968)
23. Schwick, H.G., Trobisch, H., Heimbürger, N.: Leistungsfähigkeit und Grenzen immunologischer Methoden in der Gerinnungsdiagnostik
Internist 14 160-169 (1973)
24. Suschke, J., Kunze, D., v. Pilar, C.E., Jurzik, M.L.
Veränderungen des Fettstoffwechsels und der Thrombozytenadhäsivität nach Fibrinolyse und Heparinisierung Med. Welt 24 1952-1954 (1973)
25. Suyama u. Shibuya: Urokinase: Clinico-Pharmacological Aspects about Therapeutic Dose in the Treatment of Thromboembolic Disorders
The Medical Postgraduates Vol 8, 1 1-19 (1970)
26. Talamo, R.C. Allen: Erblischer α_1 Antitrypsinmangel
New Engl. J. Med. 278 345 (1968)

Herrn Prof. Dr. H. Spieß, Direktor der
Kinderpoliklinik der Universität München,
danke ich für die Übernahme des Coreferates.

Bei meinem Referenten, Herrn Privatdozent
Dr. J. Suschke, bedanke ich mich für die
Zuweisung des Themas und seine wissenschaft-
liche Leitung.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch Herrn
Dr. C.E. von Pilar, wissenschaftlicher
Assistent der Kinderpoliklinik, für die be-
reitwillig gegebenen Anregungen und Beratun-
gen bei labortechnischen und immunologischen
Problemen.

L E B E N S L A U F

=====

Ich wurde am 18. 9. 1946 in Bielefeld (Westf.) geboren als zweites Kind des Polizeihauptmeisters Friedrich Wilhelm Steppeler und dessen Ehefrau Agnes, geb. Terlunen. Nach 4 Jahren Volksschule in Bielefeld kam ich im Jahre 1957 auf das Städt. Helmholtz-Gymnasium zu Bielefeld, wo ich im Herbst 1966 meine Reifeprüfung bestand. Im Wintersemester 1966/67 immatrikulierte ich mich in der math. nat. Fakultät der Universität zu Köln mit der Absicht, in die medizinische Fakultät Überzuwechseln. Am 2. 10. 1967 wurde ich jedoch von der Bundeswehr aus dem Studium gezogen. Nach Ableistung meiner Wehrpflicht von 18 Monaten begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität zu München. Nach dem Vorphysikum im Frühjahr 1970 und dem Physikum im Herbst 1971 bestand ich im Dezember 1974 die ärztliche Prüfung. Seit April 1973 bin ich verheiratet.

München, am 21. 1. 75

